

大黄素抑制核转录因子- κ B 在结肠癌细胞的活化

阮志燕¹, 邓向亮², 周联², 蔡琳^{1*}

(1. 广东食品药品职业学院药学院, 广州 510520; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] **目的:**利用小鼠脾淋巴细胞和结肠癌 CT26. WT 细胞混合培养体系,研究大黄素对肿瘤细胞核转录因子- κ B (NF- κ B)途径的影响,探讨其抗肿瘤的可能机制。**方法:**将密度为 1×10^5 /mL 的 CT26 细胞和脾淋巴细胞 (SLs) 分别按 1:1, 1:2, 1:4 比例混合培养 24 h 后加入大黄素再孵育 4 h, 大黄素设置 5 个浓度组: 0, 10, 20, 40, 80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别检测各组 C-C 型趋化因子 (CCL17) 在 CT26 细胞的表达, C-C 型趋化因子受体 4 (CCR4) 在 SLs 细胞表面的表达比例及 CCR4 mRNA 表达水平, CT26 细胞 NF- κ B 的活化。**结果:**与单纯 CT26 组和 SLs 组比, 混合培养各比例组均检测到 CCL17 ($P < 0.01$); 大黄素显著抑制了混合培养组 CCL17 在 CT26 细胞的分泌; 在 1:1 比例组从 $308 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $124 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。单纯 SLs 组 CCR4 的表达变化不明显; 混合培养组的 $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Tregs 表达 CCR4 的细胞比例随着大黄素浓度的增加明显下降 ($P < 0.05$), 1:4 比例组从 44.58% 下降到 32.86%; 相似的 CCR4 的 mRNA 表达随大黄素浓度增加出现明显的下调 ($P < 0.05$); 大黄素显著抑制 CT26 细胞 NF- κ B 的活化 ($P < 0.05$), p65 的平均荧光值从 $358 (0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 降至 $76 (80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 。**结论:**大黄素抑制 CT26 细胞 CCL17 的分泌, 下调 CCR4 在 Treg 细胞表面的表达比例和 mRNA 水平的表达。大黄素抑制结肠癌的机制可能和 NF- κ B 的活化相关。

[关键词] 核转录因子- κ B; 大黄素; 结肠癌细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0155-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140155

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1340.017.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 13:40

Inhibition of Emodin on Activation of Nuclear Factor Kappa B in Colon Cancer Cells

RUAN Zhi-yan¹, DENG Xiang-liang², ZHOU Lian², CAI Lin^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guangdong Food & Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** The co-culture system of mouse spleen lymphocytes (SLs) and colon cancer CT26. WT cell were used to study the influence of emodin on nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathways in tumor cells, and to explore the anti-tumor mechanism of emodin. **Method:** 1×10^5 /mL CT26 cells and spleen lymphocytes (SLs) were mixed according to the 1:1, 1:2, 1:4 ratio, and incubated for 24 h, which was cultured with emodin of different concentration (10, 20, 40, 80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 4 h. The expression of chemokine C-C motif chemokine ligand 17 (CCL17) in CT26 cells, the expression ratio of chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 4 (CCR4) on SLs surface and the levels of CCR4 mRNA, NF- κ B activation in CT26 cells were detected. **Result:** CCL17 was detected in the mixed groups ($P < 0.01$). CCL17 was markedly inhibited in the mixed group by emodin from $308 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ to $124 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ in 1:1 group. Emodin had no effect in $\text{CCR4}^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Tregs in SLs

[收稿日期] 20131121(008)

[基金项目] 广东省医学科学技术研究基金 (A2013145); 广东省中医药局建设中医药强省立项资助科研课题 (20121104); 广东食品药品职业学院自然科学研究项目 (2012YZ001)

[第一作者] 阮志燕, 博士, 讲师, 从事中药免疫学方面研究, Tel: 020-28854972, E-mail: ruanzy@gdyzy.edu.cn

[通讯作者] * 蔡琳, 博士, 讲师, 从事基础医学方面研究, Tel: 020-28854972, E-mail: 19867188@qq.com

group. But CCR4 expression of CD4⁺ CD25⁺ Tregs was decreased significantly in mixed group from 44.58% to 32.86% in 1:4 group similar to those CCR4 mRNA expression ($P < 0.05$). Emodin markedly inhibited the activation of NF- κ B of CT26 cells ($P < 0.05$), and the mean fluorescence values of p65 from 358 (0 mmol·L⁻¹) to 76 (80 mmol·L⁻¹). **Conclusion:** Emodin can reduce the secretion of CCL17 in CT26 cell, and decrease significantly the CCR4 expression of regulatory Treg cell surface and the expression of mRNA level; emodin markedly inhibit activation of NF- κ B in CT26 cells.

[**Key words**] nuclear factor kappa B; emodin; colon cancer cells

大黄素是虎杖、大黄等多种传统中药和药用植物的功效成分,近年来其在抗肿瘤方面的研究进展日益受到关注^[1]。在体内外,大黄素可以抑制多种肿瘤如淋巴瘤^[2]、胰腺癌^[3]和白血病^[4]的增殖,显著延长荷瘤小鼠的存活时间,多数研究认为这种抑瘤作用与大黄素促进肿瘤细胞的凋亡相关^[1]。但是,促进凋亡这个药理作用不足于解释与抗肿瘤有关的很多现象。

虎杖粗提物中的大黄素和大黄素甲醚被发现可以抑制肿瘤细胞的化学性趋化途径^[5]。研究者使用人白血病细胞系 Jurkat 细胞加入粗提物和 C-X-C 型趋化因子-12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 孵育 24 h,检测 Jurkat 细胞的迁移,结果表明大黄素和大黄素甲醚能够显著的抑制 Jurkat 细胞的迁移。Ok^[6] 等发现大黄素及其衍生物以不影响肿瘤细胞活力的剂量(排除凋亡的影响),通过下调肿瘤细胞表面 C-X-C 型趋化因子受体-4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4), CXCL12 的受体的表达,抑制 CXCL12 诱导的肺癌细胞 A549 和前列腺癌细胞 DU145 的迁移和侵袭。Manu^[7] 等发现大黄素下调 CXCR4 在肝癌细胞中的表达呈剂量和时间依赖性,进一步的研究显示,大黄素治疗原位肝癌模型小鼠肺转移时,显著抑制肿瘤组织中 CXCR4 的表达。由此可以推测,大黄素抗肿瘤细胞迁移的作用与影响 CXCL12/CXCR4 这一化学性趋化途径相关。

笔者前期的实验表明大黄素显著降低了调节性 T 细胞在肿瘤局部的比例^[8],推测可能是大黄素影响了调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)向肿瘤组织的趋化途径,但其抗趋化作用的具体机制并不明确。与肿瘤相关的 Tregs 的迁移研究最多的就是 CCL17/CCL22-CCR4 这一途径^[9-11]。因此本研究通过利用小鼠脾淋巴细胞和结肠癌 CT26. WT 细胞混合培养体系,研究大黄素对决定 Tregs 的重要化学性趋化信号 C-C 型趋化因子-17 (C-C motif chemokine ligand 17, CCL17) 及其受体 C-C 型趋化

因子受体-4 (C-C motif chemokine receptor 4, CCR4) 表达的影响,探讨大黄素抗 Tregs 迁徙的机制,为进一步明确大黄素抗肿瘤机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,7~8 周龄,体重(20±2)g,购自于广东省实验动物中心,许可证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 细胞和药物 小鼠结肠癌细胞株 CT26. WT (以下简称 CT26, ATCC, 批号: CRL-2639TM), 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,物种来源 BALB/c 小鼠。大黄素单体,纯度≥98%,广东中山康之源生物有限公司。大黄素使用 DMSO 助溶,并确保 DMSO 的终体积分数<0.1%。

1.3 试剂和仪器 小鼠胸腺活化调节趋化因子(CCL17/TARC)ELISA 试剂盒(上海博华生物科技有限公司),单克隆抗体 CD3-PE-CY7、CD4-FITC、CD25-APC 和 CCR4-PE (美国 eBioscience), TRIzol[®] Reagent、SuperScript[®] III Platinum[®] 一步 qRT-PCR 试剂盒和 QIAquick 凝胶提取试剂盒(美国 Invitrogen),NF- κ B 激活-核转运检测试剂盒(碧云天生物技术研究所),高通量 DNA 合成仪,PCR 仪和全自动荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems), FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 小鼠脾淋巴细胞和结肠癌 CT26. WT 细胞混合培养体系的建立

2.1.1 小鼠脾淋巴细胞(SLs)制备 小鼠颈椎脱臼处死,无菌条件下取出脾脏置于 4℃ 0.9% 生理盐水中清洗组织表面。1 mL 注射器针芯轻柔碾压组织,0.9% 生理盐水冲洗,200 目筛网过滤 2 次,去除结缔组织和细胞团。取得的细胞悬液使用 0.9% 生理盐水洗 1 次,加入 NH₄Cl-红细胞裂解液 2 mL,室温放置 5 min 至澄清透明,重复洗 1 次,去上清,使用 RPIM1640 培养基重悬。所有细胞计数后,按所需细胞密度加入相应体积 RPIM1640 培养基。

2.1.2 取处于对数生长期的 CT26 细胞,常规胰酶

消化后,将收获的细胞使用 RPIM1640 培养基配制成细胞密度为 1×10^5 /mL。如上收获 SLs,同样调整细胞密度为 1×10^5 /mL。将 CT26 细胞和 SLs 分别按 1:1,1:2,1:4 比例混合后加入 24 孔板,另设 CT26 细胞和 SLs 孔作为对照,大黄素设置 5 个浓度,每种比例每个浓度设 3 个复孔。常规共孵育 24 h 后加入大黄素再孵育 4 h,吸取培养上清及悬浮脾淋巴细胞,离心分离细胞和上清,上清保存待用。SLs 使用 PBS 洗 1 次;CT26 细胞常规胰酶消化,含血清培养基和 PBS 各洗细胞 1 次。两种细胞保存待用。

2.2 ELISA 检测 CT26 细胞分泌趋化因子 CCL17 的水平 按照试剂盒说明书进行操作,上清液样本平衡至室温,1:1,1:10,1:100 稀释 3 个浓度梯度加入样本进行检测。用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光度(A),通过绘制标准曲线求出标本中 CCL17 的浓度。

2.3 流式细胞仪检测脾淋巴细胞趋化因子受体 CCR4 的表达比例 如前所述,将获取的脾淋巴细胞重悬后,加入表面抗体 CD3-PE-CY7,CD4-FITC,CD25-APC 和 CCR4-PE 室温孵育 15 min, PBS 洗 1 次,弃上清,加 400 μ L PBS 待测;当天上机检测。以 CD3,CD4,CD25 定义为 Tregs,计算公式:

$$CCR4^+ \text{ Tregs 比} = \frac{CCR4^+ \text{ Treg 细胞数}}{\text{Treg 细胞数}} \times 100\%$$

2.4 RT-PCR 检测 CCR4 mRNA 表达水平 使用引物设计软件 Primer express 2.0 设计引物序列,中山

大学达安基因有限公司合成引物。设计的引物序列 CCR4-F: 5'-TTGCTTCATAGACTGTCCTCA-3', CCR4-R: 5'-AGTTTCATCCTGGGTGGTG-3'。使用 TRIzol 提取 SLs 总 RNA,一步法荧光定量 PCR 反应,反应条件为:50 $^{\circ}$ C 15 min,95 $^{\circ}$ C 15 min,然后 94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,共 45 个循环。内参基因为 β -actin。

2.5 NF- κ B 活化试剂盒检测 CT26 细胞 p65 的表达

通过免疫染色检测 NF- κ B 的主要亚基 p65 是否被转移到细胞核内,由此判断 NF- κ B 是否被激活。按照试剂盒说明书进行操作,NF- κ B p65 抗体使用 Cy3 染色为红色荧光,细胞核使用 DAPI 染色为蓝色荧光,用洗涤液洗涤 3 次,每次洗涤后尽量吸尽残余液体,同时要保持样品表面有些湿润,最后 1 遍洗涤完时吸尽洗涤液。滴加适当量的抗荧光淬灭封片液,尽快检测。

2.6 统计学方法 使用 SPSS 17.0 for Windows 软件对实验数据进行统计学分析。两组间样本均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 检测 CT26 细胞分泌趋化因子 CCL17 的水平 在单纯的 CT26 细胞和 SLs 培养上清中,没有检测到 CCL17,在混合培养体系中,大黄素显著抑制了 CT26 细胞分泌趋化因子 CCL17 的水平,这种抑制作用随大黄素浓度的增加而加强(表 1)。

表 1 大黄素对共培养体系中 CT26 细胞分泌 CCL17 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ng \cdot L⁻¹

浓度 /mmol \cdot L ⁻¹	CCL17				
	CT26	CT26: SLs 1:1 ³⁾	CT26: SLs 1:2 ³⁾	CT26: SLs 1:4 ³⁾	SLs
0	-	308.18 \pm 17.33	177.71 \pm 17.1	166.73 \pm 13.37	-
10 ¹⁾	-	251.33 \pm 18.31	149.55 \pm 16.68	126.5 \pm 7.26	-
20 ¹⁾	-	185.67 \pm 8.99	128.45 \pm 9.74	124.18 \pm 7.54	-
40 ²⁾	-	164.86 \pm 11.58	120.99 \pm 11.53	108.81 \pm 6.79	-
80 ²⁾	-	124.42 \pm 13.38	125.74 \pm 11.53	121.55 \pm 12.66	-

注:与 0 mmol \cdot L⁻¹ 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;各混合细胞组与单纯 CT26 组和 SLs 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 流式细胞仪检测脾淋巴细胞趋化因子受体 CCR4 的表达比例 如表 2 所示,大黄素可以降低 CCR4 在 CD4⁺CD25⁺Tregs 表面的表达。对单纯 SLs 来说,不同浓度的大黄素并不影响 CCR4 的表达;对共培养体系的 CD4⁺CD25⁺Tregs 来说,随着大黄素浓度的增加,其表达 CCR4 的细胞比例显著下降($P < 0.05$);和单纯 SLs 各组比较,浓度为 0,10,20 mmol \cdot L⁻¹ 的共培养体系的 1:2 组和 1:4 组的

CD4⁺CD25⁺Tregs 表达 CCR4 明显低于单纯 SLs 组($P < 0.05$),浓度为 40,80 mmol \cdot L⁻¹ 的共培养体系的 3 组 CD4⁺CD25⁺Tregs 表达 CCR4 均是显著低于单纯 SLs 组($P < 0.05$)。

3.3 RT-PCR 检测 CCR4 mRNA 表达水平 如表 3 所示,在 SLs 中,CCR4 在 CD4⁻细胞表面的表达量远低于 CD4⁺细胞,所以 SLs 细胞的 CCR4 mRNA 水平基本可以反映 Tregs 的 CCR4 mRNA 水平。计算

结果需用内参基因 β -actin 进行校正。CCR4 mRNA 表达量 = CCR4/内参 β -actin。与流式细胞术检测 CCR4 在细胞表面的表达相似,大黄素降低 CCR4 在 CD4⁺CD25⁺Tregs 的 mRNA 表达量。大黄素并不影

响单纯 SLs 组 CCR4 的表达;对共培养体系的 SLs 来说,随着大黄素浓度的增加,CCR4 的 mRNA 表达量显著下降;尤其是两个高浓度组(40,80 mmol·L⁻¹), CCR4 mRNA 表达量均显著低于单纯 SLs 组。

表2 大黄素对共培养体系中 CCR4⁺CD4⁺CD25⁺Tregs 细胞比例的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度/mmol·L ⁻¹	CT26: SLs			
	SLs	1:1	1:2 ³⁾	1:4 ³⁾
0	55.09 ± 1.64	53.84 ± 0.38	46.42 ± 1.04	44.58 ± 2.34
10 ¹⁾	54.62 ± 0.73	51.31 ± 1.60	41.50 ± 1.21	38.45 ± 0.73
20 ¹⁾	53.49 ± 0.41	47.18 ± 1.63	37.21 ± 1.37	36.40 ± 1.21
40 ²⁾	52.21 ± 0.67	41.45 ± 0.65 ³⁾	36.43 ± 0.72	34.00 ± 1.99
80 ²⁾	52.01 ± 0.54	40.55 ± 1.19 ³⁾	35.97 ± 2.40	32.86 ± 0.68

注:大黄素浓度 10,20,40,80 mmol·L⁻¹ 组与 0 mmol·L⁻¹ 组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 各混合细胞组与单纯 SLs 组比较³⁾ P < 0.01 (表3同)。

表3 大黄素对其培养体系中 CCR4 mRNA 的表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度/mmol·L ⁻¹	CT26: SLs			
	SLs	1:1	1:2 ³⁾	1:4 ³⁾
0	2.34 ± 0.48	2.15 ± 0.11	1.86 ± 0.16	1.65 ± 0.12
10 ¹⁾	2.18 ± 0.13	2.07 ± 0.21	1.66 ± 0.18	1.40 ± 0.29
20 ¹⁾	2.12 ± 0.15	1.80 ± 0.32	1.48 ± 0.21	1.27 ± 0.37
40 ²⁾	2.10 ± 0.14	1.69 ± 0.15 ³⁾	1.42 ± 0.13	1.16 ± 0.21
80 ²⁾	2.08 ± 0.12	1.62 ± 0.16 ³⁾	1.44 ± 0.30	1.11 ± 0.13

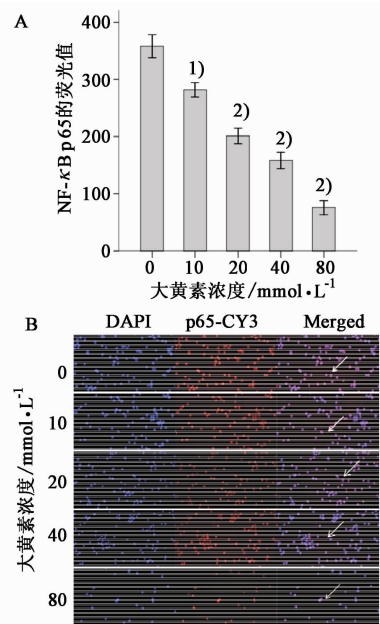
3.4 NF- κ B 活化试剂盒检测 CT26 细胞 p65 的表达

NF- κ B 是一种常见的转录因子,可以被炎症因子、生长因子或趋化因子等激活。NF- κ B 是由 p65/p50 或 p65/p65 两类亚基形成的二聚体。未被激活 NF- κ B 分布在细胞浆中。在刺激存在的情况下,活化的 NF- κ B 被转运到细胞核内促进 NF- κ B 依赖的基因转录。所以核内检测到 p65,意味着 NF- κ B 的活化。如图 1 所示,CT26 结肠癌细胞存在大量的活化的 NF- κ B,使用大黄素处理后,随着药物浓度升高,检测到进入核内的 NF- κ B 呈逐渐减少的趋势。

4 讨论

目前公认,Tregs 具有免疫抑制功能,迁徙是 Tregs 发挥免疫功能的基础。在趋化因子(存在于肿瘤组织)及其受体(表达在 Tregs 表面)的相互作用下,指引细胞迁徙到肿瘤局部,造成肿瘤微环境的免疫抑制状态^[9-13]。目前肿瘤中研究最多的就是趋化因子 CCL22/CCL17 与他们的受体 CCR4 的相互作用^[9-11]。在单纯的 CT26 细胞和未受到刺激的脾淋巴细胞的上清均未检测到 CCL17 的表达,但是在共培养体系的细胞培养上清中检测到不同水平的 CCL17,并发现大黄素显著减少了肿瘤细胞 CCL17

的表达;同时发现共培养体系中 CCR4⁺CD4⁺CD25⁺Tregs 的比例随大黄素浓度的增加而逐渐降



A. NF- κ B p65 的荧光值,与未加大黄素组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; B. DAPI 蓝色荧光染细胞核, CY3 红色荧光染 p65,软件重叠后呈粉紫色荧光(白色箭头所指)

图1 NF- κ B p65 在 CT26 细胞的表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

低,这可能与大黄素下调 CCR4 mRNA 在 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 的表达相关。由此推测大黄素影响了趋化因子 CCL17 和其受体 CCR4 的趋化作用。Svensson^[12] 等的研究也表明结肠癌组织出现 CCR4⁺ Tregs 的聚集是 Th1 型 T 细胞活化减少的主要原因,所以抑制这种 Tregs 的聚集是改善肿瘤免疫抑制的重要策略。

NF- κ B 作为一种细胞转录因子,可以双向调控一系列基因的表达,参与调控多种细胞因子、趋化因子等转录^[14]。NF- κ B 也参与肿瘤的发生发展过程,在多种肿瘤的不同发展阶段发现异常激活的 NF- κ B,推测 NF- κ B 的活化可能促进了肿瘤细胞分泌特异性的趋化因子,对募集免疫细胞进入肿瘤微环境,抑制免疫系统的抗肿瘤反应起重要作用^[15-17]。笔者检测到肿瘤细胞中 NF- κ B 活化的 CT26 细胞比例较高,使用大黄素处理后,NF- κ B 活化的 CT26 细胞比例显著减少,提示大黄素抑制了 CT26 细胞的 NF- κ B 活化。本研究通过建立体外 CT26 细胞和脾淋巴细胞的共培养体系,尽量排除其他免疫因素的影响,重点观察大黄素、肿瘤细胞和 Tregs 趋化之间的联系,为体内研究提供更可靠的依据。

结合本研究获得的实验结果,推测大黄素通过抑制 NF- κ B 的活化,下调 CT26 细胞 CCL17 的表达,减少肿瘤微环境中的 CCL17,进而导致 CCR4 在 Tregs 表面的表达下降,减少了 Tregs 在肿瘤局部的聚集,减轻肿瘤微环境的免疫抑制状态,最终抑制肿瘤的发展。

[参考文献]

- [1] 夏启松,孙仁宇,修瑞娟. 大黄素抗肿瘤分子机制研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(1):25.
- [2] Singh K B, Trigun S K. Apoptosis of Dalton's lymphoma due to *in vivo* treatment with emodin is associated with modulations of hydrogen peroxide metabolizing antioxidant enzymes [J]. Cell Biochem Biophys,2011, 67(2):439.
- [3] 刘岸,邓姿峰,胡金喜,等. 大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药,2011, 42(4):756.
- [4] Tabolacci C, Oliverio S, Lentini A, et al. Aloe-emodin as antiproliferative and differentiating agent on human U937 monoblastic leukemia cells [J]. Life Sci,2011, 89(21/22):812.
- [5] Shen M Y, Liu Y J, Don M J, et al. Combined phytochemistry and chemotaxis assays for identification and mechanistic analysis of anti-inflammatory

phytochemicals in *Fallopia japonica* [J]. PLoS One, 2011,6(11):e27480.

- [6] Ok S, Kim S M, Kim C, et al. Emodin inhibits invasion and migration of prostate and lung cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol,2012,34(5):768.
- [7] Manu K A, Shanmugam M K, Ong T H, et al. Emodin suppresses migration and invasion through the modulation of CXCR4 expression in an orthotopic model of juman hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2013,8(3):e57015.
- [8] 阮志燕,王培训,邓向亮,等. 大黄素影响调节性 T 细胞迁徙与抑制小鼠结肠癌发展相关性研究[J]. 广州中医药大学学报,2013,30(4):529.
- [9] Andalib A, Doulabi H, Maracy M R, et al. CCR3, CCR4, CCR5, and CXCR3 expression in peripheral blood CD4⁺ lymphocytes in gastric cancer patients[J]. Adv Biomed Res,2013,2:31.
- [10] Al-Haidari A A, Syk I, Jirstrom K, et al. CCR4 mediates CCL17 (TARC)-induced migration of human colon cancer cells via RhoA/Rho-kinase signaling[J]. Int J Colorectal Dis,2013,28(11):1479.
- [11] Ishida T, Ueda R. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer [J]. Cancer Sci, 2006, 97(11):1139.
- [12] Svensson H, Olofsson V, Lundin S, et al. Accumulation of CCR4⁽⁺⁾CTLA-4⁽⁺⁾FOXP3⁽⁺⁾CD25^(hi) regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells [J]. PLoS One,2012,7(2):e30695.
- [13] Ishida T, Ueda R. Immunopathogenesis of lymphoma: focus on CCR4[J]. Cancer Sci,2011,102(1):44.
- [14] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression[J]. Nature,2006,441(7092):431.
- [15] Seaton A, Maxwell P J, Hill A, et al. Inhibition of constitutive and cxc-chemokine-induced NF-kappaB activity potentiates ansamycin-based HSP90-inhibitor cytotoxicity in castrate-resistant prostate cancer cells [J]. Br J Cancer,2009,101(9):1620.
- [16] Laos S, Baeckstrom D, Hansson G C. Inhibition of NF-kappaB activation and chemokine expression by the leukocyte glycoprotein, CD43, in colon cancer cells [J]. Int J Oncol,2006,28(3):695.
- [17] Helbig G, Christopherson K N, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. J Biol Chem,2003,278(24):21631.

[责任编辑 聂淑琴]